

特許協力条約に基づく国際出願 国際予備審査請求書

出願人は、次の国際出願が特許協力条約に従って国際予備審査の対象とされることを請求する。

国際予備審査機関署名欄

国際予備審査機関の確認

請求書の受理の日

第 I 欄 国際出願の表示

出願人又は代理人の書類記号

A141-05US

国際出願番号

PCT/JP2005/005350

国際出願日 (日. 月. 年)

24.3.2005

優先日 (最先のもの) (日. 月. 年)

29.3.2004

発明の名称

不活性型Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII α ノックイン動物および同ノックイン細胞

第 II 欄 出願人

氏名 (名称) 及びあて名: (姓、名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

独立行政法人科学技術振興機構
JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY
〒332-0012 日本国埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
4-1-8, Honcho, Kawaguchi-shi, Saitama 332-0012 JAPAN

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電信番号:

出願人登録番号:

国籍 (国名): 日本国JP

住所 (国名): 日本国JP

氏名 (名称) 及びあて名: (姓、名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

山肩 葉子
YAMAGATA Yoko
〒444-0052 日本国愛知県岡崎市康生町 6 3 1 ロイヤルシティ岡崎公園 8 0 2 号
Room 802 Royalcity-Okazakikouen, 631, Kosei-cho, Okazaki-shi, Aichi 444-0052 JAPAN

国籍 (国名): 日本国JP

住所 (国名): 日本国JP

氏名 (名称) 及びあて名: (姓、名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

柳川 右千夫
YANAGAWA Yuchio
〒371-0035 日本国群馬県前橋市岩神 4-21-7 マーキス岩神 A
Markisu-Iwagami A, 4-21-7, Iwagami, Maebashi-shi, Gunma 371-0035 JAPAN

国籍 (国名): 日本国JP

住所 (国名): 日本国JP



その他の出願人が続葉に記載されている。

第Ⅲ 欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

下記に記載された者は、☒ 代理人 又は ☐ 共通の代表者 として

既に選任された者であって、国際予備審査についても出願人を代理する者である。



今回新たに選任された者である。先に選任されていた代理人又は共通の代表者は解任された。



既に選任された代理人又は共通の代表者に加えて、特に国際予備審査機関に対する手続きのために、今回新たに選任された者である。

氏名（名称）及びあて名：（姓、名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

弁理士 園谷 徹 TSUBURAYA Toru
〒530-0001 日本国大阪府大阪市北区梅田1丁目1-3
大阪駅前第3ビル1616号
Room 1616, Osaka Ekimae Dai-3 Bldg.,
1-1-3, Umeda, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka
530-0001 JAPAN

電話番号：

06-6456-0588

ファクシミリ番号：

06-6456-0589

加入電話番号：

代理人登録番号：



通知のためのあて名：

代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記欄内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。

第Ⅳ 欄 国際予備審査に対する基本事項

補正に関する記述：*

1. 出願人は、次のものを基礎として国際予備審査を開始することを希望する。



出願時の国際出願を基礎とすること。



明細書に関して



出願時のものを基礎とすること。



特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。



請求の範囲に関して



出願時のものを基礎とすること。



特許協力条約第19条の規定に基づいてなされた補正（添付した説明書も含む）を基礎とすること。



特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。



図面に関して



出願時のものを基礎とすること。



特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

2. ☐ 出願人は、特許協力条約第19条の規定に基づく請求の範囲について行った補正を無視し、かつ、取り消されたものとみなして開始することを希望する。3. ☐ 出願人が国際予備審査の開始を規則69.1(d)に基づき適用される期間の満了まで延期することを希望する。4. ☐ 出願人が国際予備審査を規則54の2.1(a)に基づき適用される期間の満了よりも早く開始することを明示的に希望する。

*記入がない場合は、1)補正がないか又は国際予備審査機関が補正（原本又は写し）を受領していないときは、出願時の国際出願を基礎に予備審査が開始され、
2)国際予備審査機関が、見解書又は予備審査報告書の作成開始前に補正（原本又は写し）を受領したときは、これらの補正を考慮して予備審査が開始又は続行される。

国際予備審査を行うための言語は、日本語であり、



国際出願の提出時の言語である。



国際調査のために提出した翻訳文の言語である。



国際出願の公開の言語である。



国際予備審査の目的のために提出した翻訳文の言語である。

第Ⅴ 欄 国の選択

この様式を用いてされた国際予備審査の請求は、指定され、かつPCT第Ⅱ章に拘束される全ての締約国を選択する国際予備審査の請求となる。

第VI相関 照合相関

この国際予備審査請求書には、国際予備審査のために、第IV欄に記載する言語による下記の書類が添付されている。

- | | | |
|--|---|---|
| 1. 国際出願の翻訳文.....: | 1 | 枚 |
| 2. 特許協力条約第34条の規定に基づく補正書.....: | 1 | 枚 |
| 3. 特許協力条約第19条の規定に基づく補正書
(又は、要求された場合は翻訳文)の写し.....: | | 枚 |
| 4. 特許協力条約第19条の規定に基づく説明書
(又は、要求された場合は翻訳文)の写し.....: | | 枚 |
| 5. 書簡.....: | 1 | 枚 |
| 6. その他(書類名を具体的に記載): | | 枚 |

国際予備審査機関書記入欄

受 領 未 受 領

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

この国際予備審査請求書には、さらに下記の書類が添付されている。

- | | |
|---|--|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙 | 5. <input type="checkbox"/> 記名押印(署名)の欠落についての説明書 |
| <input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面 | 6. <input type="checkbox"/> コンピュータ読み取り可能な形式による配列表 |
| <input checked="" type="checkbox"/> 国際事務局の口座へ振込を証明する書面 | 7. <input type="checkbox"/> コンピュータ読み取り可能な形式による配列表に関連するテーブル |
| 2. <input type="checkbox"/> 個別の委任状の原本 | 8. <input type="checkbox"/> その他(書類名を具体的に記載): |
| 3. <input type="checkbox"/> 包括委任状の原本 | |
| 4. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し(あれば包括委任状番号): | |

第VII相関 出願人、代理人又は共通の代表者の記名押印

各人の氏名(名称)を記載し、その次に押印する。

圓谷徹
TSUBURAYA Toru



国際予備審査機関書記入欄

1. 国際予備審査請求書の実際の受理の日

2. 規則 60.1(b)の規定による国際予備審査請求書の受理の日の訂正後の日付

- | | |
|---|--|
| 3. <input type="checkbox"/> 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理。
ただし、以下の4,5の項目にはあてはまらない。
<input type="checkbox"/> 出願人に通知した。 | 6. <input type="checkbox"/> 規則 54 の 2.1(a)の期限の経過後の国際予備審査請求書の受理。
ただし、以下の7,8の項目にはあてはまらない。 |
| 4. <input type="checkbox"/> 規則80.5により延長が認められている優先日から19月の期間内の国際予備審査請求書の受理 | 7. <input type="checkbox"/> 規則 80.5 により延長が認められている規則 54 の 2.1(a)の期限内の国際予備審査請求書の受理。 |
| 5. <input type="checkbox"/> 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理であるが規則82により認められる。 | 8. <input type="checkbox"/> 規則 54 の 2.1(a)の期間の経過後の国際予備審査請求書の受理であるが規則 82 により認められる。 |

国際事務局書記入欄

国際予備審査請求書の国際予備審査機関からの受領の日:

特許協力条約に基づく国際出願

第 II 章

手数料計算用紙

国際予備審査請求書の附属書

国際予備審査機関書記入欄

国際出願番号

PCT/JP2005/005350

出願人又は代理人の書類記号

A141-05US

国際予備審査機関の日付印

出願人

独立行政法人科学技術振興機構

所定の手数料の計算

1. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律（国内法）
第18条第1項第4号の規定による手数料
（予備審査請求料）（注1）

36,000 円

P

2. 取扱手数料（注2）

17,600 円

H

3. 所定の手数料の合計

P及びHに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入

53,600 円

合 計

（注1） 法第18条第1項第4号の規定による手数料については、特許印紙をもって納付しなければならない。

（注2） 取扱手数料については、国際予備審査機関である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振り込みを証明する書を提出することにより納付しなければならない。



予備審査手数料

36,000円

ご利用明細

UFJ銀行をご利用いただきありがとうございます。

年	月	日	お取扱店			銀行番号	口座店	口座番号
17	09	27	0219	063	0025	M1	0008	TEL 06-6456-0588
							お取引先	お取引金額
							お振込み	¥17600
お 客 さま へ							時刻	おつり 差引現在残高
* *フリコム イライ ナイヨウ* トウキヨウミツヒシ トウノモン フツウ 2,074,896 ショウヒセ イコム テスウリヨウ ¥420 WIPO-PCT GENEVA サマ ヽ 100115026 ツフアラ トオル サマ カラ							0919	¥1980*****



UFJ銀行

取扱手数料 17,600円

手続補正書
(法第11条の規定による補正)


特許庁審査官 殿

1. 国際出願の表示 PCT/JP2005/005350

2. 出願人

名 称 独立行政法人科学技術振興機構
JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY
あて名 〒332-0012 日本国埼玉県川口市本町4丁目1番8号
4-1-8, Honcho, Kawaguchi-shi, Saitama
332-0012 JAPAN
国 籍 日本国 Japan
住 所 日本国 Japan

3. 代理人

氏 名 (11502) 弁理士 圓谷 徹 
TSUBURAYA Toru
あて名 〒530-0001 日本国大阪府大阪市北区梅田1-1-3
大阪駅前第3ビル1616号
Room 1616, Osaka Ekimae Dai-3 Bldg.,
1-1-3, Umeda, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka
530-0001 JAPAN

4. 補正の対象

請求の範囲

5. 補正の内容

- (1) 請求の範囲第19頁第2項を、「野生型と比較して脳内側坐核における神経活動が相対的に低下している一方、大脳皮質および線条体での神経活動は野生型と比較して実質的な差異がないことを特徴とする請求項1記載の不活性型CaMKII α ノックイン非ヒト動物。」に補正する。
- (2) 請求の範囲第19頁第3項を、「遺伝子ターゲティング法により作製されたことを特徴とする請求項2記載の不活性型CaMKII α ノックイン非ヒト動物。」に補正する。

- (3) 請求の範囲第19頁第4項を、「CaMKII α の触媒ドメインにおける1又は複数のアミノ酸残基を改変したことを特徴とする請求項3記載の不活性型CaMKII α ノックイン非ヒト動物。」に補正する。
- (4) 請求の範囲第19頁第5項を、「ATPとの結合に必要な1又は複数のアミノ酸残基を改変したことを特徴とする請求項4記載の不活性型CaMKII α ノックイン非ヒト動物。」に補正する。
- (5) 請求の範囲第19頁第6項を、「ATPとの結合に必要なリジン残基を改変したことを特徴とする請求項5記載の不活性型CaMKII α ノックイン非ヒト動物。」に補正する。
- (6) 請求の範囲第19頁第7項を、「齧歯目動物であることを特徴とする請求項2～6のいずれか1項に記載の不活性型CaMKII α ノックイン非ヒト動物。」に補正する。
- (7) 請求の範囲第19頁第8項を、「マウスであることを特徴とする請求項7記載の不活性型CaMKII α ノックイン非ヒト動物。」に補正する。

6. 添付書類の目録

請求の範囲第19頁

請求の範囲

1. 相同染色体の一方又は双方の Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II α (CaMKII α) 遺伝子を不活性型に置換し、不活性型 CaMKII α を発現するように改変することによって CaMKII α のプロテインキナーゼ活性が特異的に障害される一方、CaMKII α のカルモジュリン結合能およびサブユニット同士の多量体形成能は保持されていることを特徴とする不活性型 CaMKII α ノックイン非ヒト動物。
2. (補正後) 野生型と比較して脳内側坐核における神経活動が相対的に低下している一方、大脳皮質および線条体での神経活動は野生型と比較して実質的な差異がないことを特徴とする請求項 1 記載の不活性型 CaMKII α ノックイン非ヒト動物。
3. (補正後) 遺伝子ターゲティング法により作製されたことを特徴とする請求項 2 記載の不活性型 CaMKII α ノックイン非ヒト動物。
4. (補正後) CaMKII α の触媒ドメインにおける 1 又は複数のアミノ酸残基を改変したことを特徴とする請求項 3 記載の不活性型 CaMKII α ノックイン非ヒト動物。
5. (補正後) ATP との結合に必要な 1 又は複数のアミノ酸残基を改変したことを特徴とする請求項 4 記載の不活性型 CaMKII α ノックイン非ヒト動物。
6. (補正後) ATP との結合に必要なリジン残基を改変したことを特徴とする請求項 5 記載の不活性型 CaMKII α ノックイン非ヒト動物。
7. (補正後) 齧歯目動物であることを特徴とする請求項 2～6 のいずれか 1 項に記載の不活性型 CaMKII α ノックイン非ヒト動物。
8. (補正後) マウスであることを特徴とする請求項 7 記載の不活性型 CaMKII α ノックイン非ヒト動物。
9. 相同染色体の一方又は双方の Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II α (CaMKII α) 遺伝子を不活性型に置換し、不活性型 CaMKII α を発現するように改変することによって CaMKII α のプロテインキナーゼ活性が特異的に障害される一方、CaMKII α のカルモジュリン結合能およびサブユニット同士の多量体形成能は保持されていることを特徴とする不活性型 CaMKII α ノックイン細胞。

答 弁 書

特許庁審査官 殿

1. 国際出願の表示 PCT/JP2005/005350

2. 出願人

名 称 独立行政法人科学技術振興機構
JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY
あて名 〒332-0012 日本国埼玉県川口市本町4丁目1番8号
4-1-8, Honcho, Kawaguchi-shi, Saitama
332-0012 JAPAN
国 籍 日本国 Japan
住 所 日本国 Japan

3. 代理人

氏 名 (11502) 弁理士 圓谷 徹
TSUBURAYA Toru
あて名 〒530-0001 日本国大阪府大阪市北区梅田1-1-3
大阪駅前第3ビル1616号
Room 1616, Osaka Ekimae Dai-3 Bldg., 1-1-3,
Umeda, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka
530-0001 JAPAN

4. 通知の日付 19. 07. 2005

5. 答弁の内容

(1) 答弁の趣旨

国際調査見解書において、文献1-4を引用し、本願請求の範囲1-9の発明について、進歩性を欠如する旨の見解が示されました。

しかしながら、出願人は、上記見解に不同意のため、以下意見を具申し、審査官殿にご再考を求める次第です。なお、本書と同日付で手続補正書を提出しましたので、あわせてご検討ください。

(2) 本発明の特徴

本発明は、「CaMKII α のプロテインキナーゼ活性が特異的に障害」されている不活性型CaMKII α ノックイン動物および同ノックイン細胞に関するものであり、「不活性型」とは正にプロテインキナーゼ活性が特異的に障害されていることを意味します([0009]段落)。

従来は、CaMKII α のプロテインキナーゼ活性を欠失させた動物として、同遺伝子を破壊し、CaMKII α 蛋白自体をなくしてしまった単純ノックアウトマウスが作製され、記憶・学習におけるCaMKII α の役割などについて脳機能解析が行われてきました([0005]段落)。しかし、単純ノックアウトマウスでは、蛋白自体をなくしているため、(1) プロテインキナーゼとしての機能、(2) カルモジュリンと結合する機能、(3) CaMKII サブユニット同士が結合して、あるいは他の蛋白質と結合して構造蛋白として働く機能、のすべてが失われており、ノックアウトマウスで認められた種々の異常が、(1)~(3)のうち、どの機能が失われたことによるものかが不明であり、したがって、脳機能解析の解釈が十分に行えない、という問題がありました。

そこで、CaMKII α の重要性に鑑み、プロテインキナーゼの機能のみ特異的に障害された、いわば「機能的ノックアウト動物」を作製することの要請が従来から強くあり、本発明はこの要請に応えるべくなされたものです。

また、補正後の請求の範囲2に記載される本発明のノックイン動物は、「野生型と比較して脳内側坐核における神経活動が相対的に低下している一方、大脳皮質および線条体での神経活動は野生型と比較して実質的な差異がない」ことを特徴としています。この特徴により、本発明のノックイン動物は、精神疾患の病態の解明や治療法の検索のためのモデル動物としても有用です([0019][0044][0045]段落)。

なお、補正によって追加した下線部は、本願明細書[0069]段落の記載などに基づくものであり、何ら新規事項を追加するものではありません。

(3) 引用文献(文献1-4)の記載と本発明との対比

(3-1) 文献1に記載されるノックアウトマウスについて

文献1には、相同組換えによりCaMKII α 遺伝子を不活化した変異マウスを作製し

た旨記載されていますが(798ページ左欄の下から2行目～右欄2行目)、この変異マウスは、CaMKII α ノックアウトマウスと考えられます。

先の(2)第2段落で述べたように、従来のCaMKII α ノックアウトマウスでは、脳機能解析の解析が十分に行えない、という問題がありました。さらに、文献1には、CaMKII α ノックアウトマウスの解析から、CaMKII α が記憶やシナプスの長期増強(LTP)に重要であることは既に明白である、という記述がなされていますが、しかし、添付の文献5に記載されているように、CaMKII α ノックアウトマウスについてさらに詳しい検討を行うと、大脳皮質の可塑性や学習・記憶に障害が観察されるのは、CaMKII α ノックアウトマウスのうち約半数に限られ、残りの半数には異常が認められませんでした。このような所見の不安定さは、ノックアウトマウスの利用に際して、大きな制限となります。

一方、CaMKII α の蛋白としての発現を保ちながら、その蛋白機能のひとつであるプロテインキナーゼ活性のみをなくした、特異性の高い本発明のノックイン動物では、蛋白自体の欠損によって引き起こされる種々の代償作用が生じる可能性が低いいため、症状の不安定要因が相当少ないものとなります。

さらに、文献6と7の方法の項(文献6では3380ページ左欄中程、文献7では345ページ右欄中程)に記載されているように、CaMKII α ノックアウトマウスでは、繁殖能力に問題があり、詳細な解析を行うために、十分な数のマウスを揃えることが困難です。従って、各種疾患モデル、あるいは治療薬開発の手段として用いる際には、著しい制限となります。一方、本発明のノックイン動物では、その出生がメンデルの法則に従っている事実から明らかなように([0067]段落)、繁殖能力にはまったく問題がないため、このような問題は生じません。

(3-2) 文献1、3に記載されるノックインマウスと文献2の記載について

CaMKII α について、文献1に引用されている Thr-286、あるいは、文献1と文献3に記載されている Thr-305/306 をそれぞれ他のアミノ酸残基に置き換えたノックインマウスが既に作製されていますが、これらのマウスは、調節ドメインに在る自己リン酸化部位が改変されたものであり(文献8参照)、「CaMKII α のプロテインキナーゼ活性が特異的に障害」されたものではありません。

このように、従来のノックインマウスは本発明のノックイン動物とは発現するCaMKII α の機能が相違する上、その改変位置も相当異なります。文献8に記載されている実際のゲノム遺伝子構造(335ページFig. 2)から明らかなように、CaMKII α ゲノム遺伝子は 50,000 塩基対以上の長さを持つ巨大遺伝子で、18ものエクソンから構成されています。そして、上記 Thr-286 はエクソン11に、上記 Thr-305/306 はエクソン12に該当するのに対して、本発明の実施例でターゲットとした Lys-42 は、これらエクソンから遙かに離れたエクソン2に該当します([0013]段落)。遺伝子ターゲッティング法を用いたノックイン動物の作製では、変異を起こさせた遺伝子断片と、それに対応するゲ

ノム遺伝子部位との間で相同組み換えを起こさせることが必要ですが、その相同組み換えの起こる頻度は、ゲノム遺伝子の部位によってまちまちです。従って、遠く離れた異なるエクソンをターゲットとする相同組み換えは、まったく別の遺伝子をターゲットとした相同組み換えを起こさせるに等しく、相当の技術的困難を伴うものであり、現に本発明のノックインマウスの作製には幾年もの年月を要しています。また、文献2には、Lys-42をMet-42またはArg-42に置換したCaMKII α 蛋白をCOS7細胞に発現させたことが開示されています(945ページ右欄2～7行目)が、この方法は点変異を起こさせた相補的 DNA を一過性に細胞に導入・発現させたものであって、相同組み換えによって永久的にゲノム遺伝子を改変したものではありません。

上記方法により作製された本発明のノックインマウスは、プロテインキナーゼ活性のみ特異的に障害されているため、本願明細書[0034]～[0045]段落に記載されるように、従来のノックインマウスにはない様々な効果、有用性を有しますので、この点からも本発明のノックイン動物は進歩性を有するものといえます。

(3-3) 文献4の記載について

さらに、本発明のノックインマウスにおいては、チトクロームオキシダーゼ活性染色によって、側坐核における神経活動が低下していることが明らかになりました([0069]段落)が、この所見は、文献4に記載されているような、CaMKII α の脳内分布からは、全く予測できないものです。すなわち、CaMKII α は脳内に広く分布し、中でも、特に海馬に多く、次に大脳皮質や線条体、扁桃体、側坐核などに多く存在します(文献4の8ページFig. 4参照)。この分布から考えると、神経活動の調節に関与すると考えられるCaMKII α のプロテインキナーゼ活性をなくした本発明のノックイン動物においては、まず海馬で大きな神経活動の低下が、そして、大脳皮質、線条体、扁桃体、側坐核において、一定の神経活動の低下が観察されるものと期待できます。しかしながら、本発明のノックインマウスにおいては、側坐核において特異的に神経活動の低下が認められる一方、大脳皮質および線条体での神経活動は野生型と比較して実質的な差異がありませんでした。この所見は、CaMKII α の脳内分布からはまったく予測不可能であり、本発明のマウスを作製して始めて明らかになった事実です。

(4) 結語

以上のように、本発明は、文献1-4記載の技術内容とは明確に相違し、十分に進歩性の要件を具備するものですので、ご再考を宜しくお願い致します。

6. 添付書類の目録

下記文献5-8の写し

各1部

文献5. Neuron, 17: 491-499, 1996

文献6. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 3380-3383, 1997

文献7. Learning and Memory, 5: 344-354, 1998

文献8. FEBS Letters, 396: 333-336, 1996